

Advancement of the Brown Norway rat as a model for food allergy : route of exposure - immunomodulation - allergogenomics

Citation for published version (APA):

de Jonge, J. D. (2009). *Advancement of the Brown Norway rat as a model for food allergy : route of exposure - immunomodulation - allergogenomics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20091127jj>

Document status and date:

Published: 01/01/2009

DOI:

[10.26481/dis.20091127jj](https://doi.org/10.26481/dis.20091127jj)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

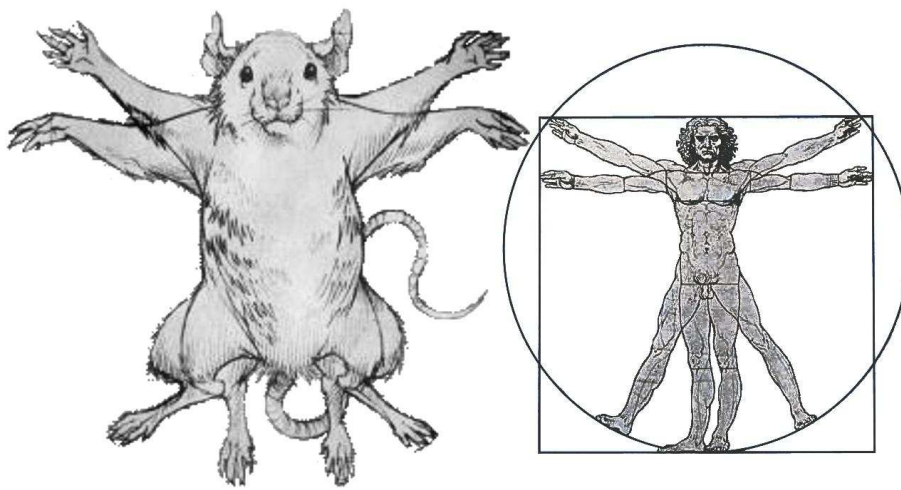
repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

0

Chapter 6

Summary and general discussion



MAIN FINDINGS

Food allergy is a puzzling problem of our modern era due to its relatively high prevalence, its potentially fatal symptoms and its impact on social life. Furthermore, our continuously advancing food chain may be further supplemented by the rise of the use of genetically modified organisms, which may introduce new potentially allergenic proteins. Risk assessment of food allergens is still in its infancy mainly because of the fact that the most sensitive patients are not enrolled in challenge studies to assess threshold levels for elicitation. In addition, several factors have an effect on the prevalence of food allergy, and might thus be included in the risk assessment of food allergy, the most important being genetic factors and environmental factors. Currently no validated animal models to study food allergy are available. Not only may such animal models aid in helping understanding how environmental factors impact the expression of food allergy, they may also be of value for identification of novel food allergens. In this thesis the further development of an experimental rodent model for food allergy is described, and the model is applied to investigate effects of immunomodulatory compounds on food allergy. Furthermore, gene expression profiles as a novel tool to be applied in food allergy research were studied in this model. The main findings of this thesis can be summarized as:

- Brown Norway (BN) rats showed allergic sensitization to peanut allergens after ingestion via the oral route, but only when the rats were bred on a peanut- and soy-free diet (**Chapter 2**). Soy proteins and peanut proteins show cross-reactivity, e.g. preexposure to soy influences the status of sensitization and/or lead to tolerance when subsequently exposed to peanut.
- The most renowned allergens contained in peanut are three sugar-protein molecules named 'Ara h1', 'Ara h2' and 'Ara h3'. Rats orally sensitized to peanut extract (PE) recognized all tested major peanut allergens; Ara h1-3 whereas intraperitoneally (i.p.) sensitized rats only recognized Ara h1 and Ara h2 (**Chapter 2**). Indicating the importance of the route of exposure in allergen recognition. In contrast to i.p. dosing, oral dosing involves both oral mucosa and gut and the accompanying mucosal immune systems, which may lead to induction of IgE responses and/or oral tolerance to different allergens in orally compared to i.p. exposed rats.
- Cholera toxin (CT) enhanced allergic sensitization to a limited extent (**Chapter 2**).
- The immunosuppressant bis(tributyltin)oxide (TBTO) suppressed food allergy against both peanut and ovalbumin (an allergen present in hen's egg white) on multiple levels in the food allergic response (**Chapter 3**)
- The bacterial strain *Lactobacillus casei* Shirota (LcS), claimed to have an impact on food allergy, failed to suppress the food allergic response to peanut in our model. Moreover, LcS shifted the Th1/Th2 ratio towards Th2

dominance both at the level of cytokine production and immunoglobulin production (**Chapter 4**).

- **Chapter 5** described for the first time the effect of oral exposure to peanut on the level of gene expression and it was shown that gene expression changes were both dose- and time-dependent. The most important pathway (in this context a set of related responses within a specific process (e.g. cell proliferation)), that was regulated after oral administration, was that of cell division. In addition, immunological processes were activated.

RODENT FOOD ALLERGY MODELS: ISSUES TO CONSIDER

In order to successfully assess the effect of both allergens and (potential) immunomodulation by food constituents or food contaminants on the allergic response, we investigated a range of conventional parameters at multiple levels of the food allergic process. It was apparent from our studies that in our experimental model for food allergy, this range of parameters at multiple levels of the food allergic process helped in the interpretation of the effect of these interventions. Complimentary to these conventional parameters, this thesis also investigated other novel parameters that could potentially be used as biomarkers for food allergy. The application possibilities of animal models for food allergy may lie in investigations of effects of environmental factors and food components on food allergic processes, as well as in the identification of allergenic activities of a new food to which no a priori exposure in the population is apparent. In the development of animal models of food allergy several issues need to be considered:

Species and strain

Various animal models for food allergy are presently in use including models in mice, rats, dogs and swines (Dearman and Kimber, 2009). We will briefly discuss the two most popular species in this research: mice and rats.

The species most commonly favoured with respect to animal model development for food allergy is the mouse. This is largely driven by the availability of various immunological and molecular reagents, including transgenic animals in which particular genes of interest have been over expressed or deleted. A major advantage for studies involving IgE antibody responses is the availability of inbred and congenic high IgE responder mouse strains, such as the high IgE responder BALB/c strain (Dearman and Kimber, 2007; Mori et al., 1990; Yamanishi et al., 2003) and the C3H/HeJ strain (Li et al., 1999; van Wijk et al., 2004). As such, these strains have analogy with the susceptible (atopic) human phenotype that has a propensity to develop IgE-mediated disease, facilitating the identification of potentially allergenic proteins. Mice are most often dosed i.p. for sensitization to the allergen with or

without the use of an adjuvant, an alternative that is also regularly applied are mice dosed orally for sensitization to the allergen in the presence of an adjuvant.

Other rodent species, particularly the BN rat have been the experimental model of choice for many investigators (Akiyama et al., 2001; de Jonge et al., 2007; Jia et al., 2005; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1998b; Pilegaard and Madsen, 2004). The BN rat is a high-immunoglobulin (particularly IgE) responder rat strain that to a certain degree resembles atopic humans in their genetic predisposition to react with an overproduction of IgE to antigens. In addition, clinical reactions, including increased gut permeability and changes in blood pressure and respiratory function, were observed in BN rats after an oral challenge (Knippels et al., 1999b) and the profile of allergens recognized by the immune system of the BN rat appeared comparable with the profile of allergens recognized by allergic patients (Knippels and Penninks, 2003). One of the advantages of this model is that these rats can be sensitized orally in the absence of an adjuvant (Akiyama et al., 2001; de Jonge et al., 2007; Jia et al., 2005; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1998b; Pilegaard and Madsen, 2004). Furthermore, this rat, due to its size, offers the possibility to monitor within individual animals the kinetics of specific serum antibody (IgE and IgG) responses. Moreover, rats, unlike mice, are routinely used in toxicity studies, which may also lead to an easier integration process of food allergy assessment studies in rat models into the current line of safety studies.

Dietary exposure to the allergen or cross-reactive proteins

An important aspect that should be considered with regard to the development of a food allergy model is uncontrolled dietary pre-exposure of the test animals and their parental generations to the allergen under investigation. Exposure of the parental generation to the antigen under investigation influences the outcome of oral sensitization studies with the offspring, at least two generations of animals should be bred on a diet free of the antigen under investigation. For instance: Knippels *et al.* (Knippels et al., 1998a) described that soy-specific IgG antibodies could not be detected after two generations bred on soy-free diet. Animal feed may contain proteins that are identical to the proteins that will be tested, or may share cross reactivity with these proteins. It is evident that previous exposure of the test animals to proteins that will be the focus of the investigation will have an impact on the status of sensitization and/or lead to tolerance. This thesis shows that exclusion of such proteins in the diet of the test animals for a number of generations is a prerequisite for a proper function of the model (**Chapter 2**). This underlines the importance of diet restrictions in oral models for food allergy as has been shown previously (Knippels et al, 1998a, Brix et al. 2005, Christensen et al 2003, 2004).

Route of exposure

Exposure to food allergens in humans is predominantly by oral consumption of allergens present in food. After oral exposure, proteins can be digested in the gastrointestinal tract, which may subsequently lead to presentation of different antigenic structures to the mucosal immune system. Some models involve i.p. sensitization, but as oral administration represents the most appropriate route of exposure for a method designed to identify potential food allergens, oral models for food allergy are preferred. This rationale is supported by experimental data. **Chapter 2** showed that although the responses of animals that were either i.p. or orally sensitized to peanut to one of the three tested purified peanut allergens (*Ara h1*) were comparable, the responses differed for the remaining two purified allergens (*Ara h2* and *Ara h3*). The specific IgG2a response (Th2-mediated in rat) against *Ara h2* in i.p. sensitized animals was twice that of orally sensitized animals. Moreover, the specific IgG2a response against *Ara h3* was not found in the i.p. sensitized group but was found in 50% of the orally sensitized group. After oral exposure, proteins can be digested in the gastrointestinal tract, which may lead to presentation of different antigenic structures compared to i.p. exposure, without digestion. In contrast to i.p. dosing, oral dosing involves both oral mucosa and gut (Madsen and Pilegaard, 2003) and the accompanying mucosal immune systems, which may lead to induction of IgE responses to different allergens in orally compared to i.p. exposed rats. The data as presented in **Chapter 2** indicate that oral sensitization in comparison to i.p. sensitization of BN rats better reflects the responses as observed in peanut allergic patients where specific IgE responses against *Ara h1-3* are observed (Koppelman et al., 2004).

Adjuvation

Most animal models used in food allergy research, both pertaining to i.p. and oral models, incorporate the use of an adjuvant for successful sensitization to the protein under investigation. Adjuvant is applied to boost the allergic responses to allergens that may have a low intrinsic allergenic potential. Drawbacks might be that such adjuvants may add to the complexity of the model, and renders the mode of sensitization probably different from how humans are sensitized. Inclusion of an adjuvant may increase sensitivity, but this may go at the cost of selectivity. The BN rat model is one of the few experimental models for food allergy that allows for oral sensitization, without the use of an adjuvant. Furthermore, BN rats can discriminate between strong- (ovalbumin), weak- (bovine serum albumin) and non-allergenic (potato acid phosphatase) proteins after oral exposure without the use of any adjuvants (Jia et al., 2005). Moreover, the orally sensitized BN rat as a model for food allergy can result in 100% IgE-responders, even without the use of an adjuvant, if preconditions such as allergen free diets are carefully met (**Chapter 2**).

Other factors

Other factors, including gender and age of animals, are also known to contribute to the sensitivity of oral allergy induction. Pilegaard and Madsen (Pilegaard and Madsen, 2004) demonstrated that sensitization of female BN rats to egg allergens offered a higher amount of IgE-responders (38-75%) than did males (13-38%). With age the immune system matures which makes sensitization more difficult. BN rats become less Th2-prone with age (Ide et al., 1999; van der Meide et al., 1995) and consequently less apt to sensitization (Ide et al., 1999; Pauwels et al., 1979). For this reasons we used female rats that were 3-4 weeks of age at study initiation.

Finally, the matrix in which the protein is presented is of importance for determining the allergenicity of the protein in an experimental model for food allergy (van Wijk et al., 2005), since some food constituents have the potential to modulate allergic responses to allergens.

Ideally, test animals should, next to sensitization as measured by allergen-specific IgE responses, show clinical reactions with respect to organ sensitivities that reflect responses seen in humans upon a challenge with the allergen. The model should be relatively easy to conduct and reproducible in time and different laboratories (Penninks and Knippels, 2001). Although all these criteria (i.e. oral exposure, no requirement for the use of an adjuvant, clinical manifestations, reproducibility and ease to perform) are difficult to attain in one model, the oral food allergy model developed in BN rats and presented in this thesis might provide a suitable model to study the allergenicity of food proteins in humans. This notion is also supported in publications describing studies in BN rats (Atkinson et al., 1996; Atkinson and Miller, 1994; Jia et al., 2004; Jia et al., 2005; Knippels et al., 1999a; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1999b; Knippels et al., 1998b; Knippels et al., 1999c; Knippels et al., 2000; Ogawa et al., 2003; Pilegaard and Madsen, 2004).

LIMITATIONS OF THE BROWN NORWAY RAT AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR FOOD ALLERGY

Although our BN rat food allergy model has many advantages as an experimental model, it also has some drawbacks.

These drawbacks for the assessment of risks include:

1. the BN rat is an inbred strain of rats: although the high Coefficient of Inbreeding increases the likeliness that one BN rat's immune reaction resembles that of another (and thus decreases the number of animals needed in each group), the drawback is that as a model it has not the wide genetic diversion as seen in atopic humans;

2. absence of anaphylactic reactions: the absence of anaphylactic reactions in BN rats differs with the strong anaphylactic reactions that occur in humans. This difference between BN rats and atopic patients is of special relevance since anaphylaxis is both life-threatening and greatly contributing to the suffering of food allergic patients;
3. single gender: the use of female BN rats as applied in our further development of the BN rat food allergy model, increased the sensitivity to the antigens of interest (and thus decreases the number of animals needed in each group), but also does not resemble the human situation in which atopic patients are represented by both genders; and
4. possible underestimation of the effect of immunostimulants: **Chapter 2** described that the adjuvant CT was not capable of substantially increasing the severity of the allergic response to peanut proteins, this could imply that this model might be suboptimal to address the effect of immunostimulants on the food allergic response.

UTILITY OF A FOOD ALLERGY MODEL IN BN RATS

The first rule of toxicology is that all substances produce an effect, but it is the dose that decides whether the effects are adverse or beneficial (Paracelsus (1493-1541); “Dosis sola facit venenum” (only the dose determines whether something is poisonous)). As indicated above, besides the dose, also other factors, including environmental factors or other components in the food than the allergens themselves, determine the outcome of the food allergy. There is a difference between hazards (the potential to cause adverse effects) and risks (the actual risk that these adverse effects do occur). In food allergy validated animal models for food allergy could be used, besides for hazard identification, also for risk assessment, especially to probe factors influencing risk, such as environmental factors or food components other than the allergen itself.

Immunodulatory effects investigated with the BN rat food allergy model

The effects of three different immunomodulators were studied in this thesis. In **Chapter 2** effects of the mucosal adjuvant CT was studied. For this purpose BN rats were sensitized to peanut by daily oral gavage and the CT-groups were simultaneously with the peanut dosing also exposed to a daily oral dosing of CT. The adjuvant CT had only limited effects in this model. Adjuvation with CT enhanced the magnitude of IgE and to a lesser extent IgG1 but not of IgG2a, rat mast cell protease 2 (RMCP2) levels, numbers of granulocytes and cytokine levels. This indicates that in rats bred on a soy- and peanut-free diet, oral sensitization may already have been nearly optimal and CT could not greatly increase the sensitivity of the model.

Chapter 3 described the influence of the immunosuppressive compound TBTO, present in the food chain, on the development of food allergy to peanut or ovalbumin in BN rats. To study these effects BN rats were sensitized to either peanut or ovalbumin by daily oral gavage and the TBTO-groups were fed a diet containing TBTO. Co-exposure to TBTO not only resulted in decreased general immunologic parameters, but also had a suppressing effect on allergic parameters. TBTO decreased allergen-specific Th2 cytokine production by spleen cells, allergen-specific IgE, number of eosinophilic and basophilic granulocytes in the blood and production of mast cell protease II after oral food challenge.

After investigating such different immunomodulating effects on the food allergic response in our model, i.e. the effects of the immunosuppressant (TBTO) and those of the immunostimulant (CT), we tested the effect of *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) on the food allergic process against peanut (**Chapter 4**). Figure 1 gives a simplified overview of the interactions of the immunomodulators CT and TBTO with the immune system, and also depicts where *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) has an impact. We hypothesized an immunosuppressive effect of this bacterial strain that is proposed to have probiotic (probiotica – literally “for life”) activity. Unexpectedly, we did not find LcS to suppress the food allergic response against peanut. Moreover, in our peanut allergy model (**Chapter 4**) it was found that LcS shifted the Th1/Th2 ratio towards Th2 dominance on both the level of cytokine production and immunoglobulin production. The most pronounced effect of LcS noted in this study was on IL-4 production by spleen and mesenteric lymph node (MLN) cells. LcS was also capable of stimulating early peanut extract (PE)-specific IgE-levels and PE-specific IgG levels. This is in contrast to three studies on food allergy in rodents that describe decreased IgE levels (Matsuzaki and Chin, 2000; Matsuzaki et al., 1998; Shida et al., 2002), LcS has also been described to decrease IgE levels produced by *in vitro* restimulated splenocytes from OVA-primed mice (Shida et al., 1998). In a respiratory allergy model LcS did not reduce IgE levels (Ezendam and van Loveren, 2008).

What does this mean for the situation in humans? First, it should be noted that effects of probiotics depend on viability, dose, time, length of treatment, mode of

treatment, prenatal exposure and strain (Broekaert and Walker, 2006; de Waard et al., 2003; Kalliomaki and Isolauri, 2004; Prescott et al., 2005; Savilahti et al., 2008). Furthermore, it has been shown that the effects of bacterial strains on the immune system depend on the immunological state of an individual (Pelto et al., 1998; Roessler et al., 2007). Pelto *et al.* (Pelto et al., 1998) have shown that *Lactobacillus* GG (LGG)-supplementation resulted in an increased expression of phagocytosis receptors in healthy subjects, whereas LGG-supplementation resulted in suppressed expression of these receptors in milk-hypersensitive subjects. Roessler *et al.* (Roessler et al., 2007) claimed to have shown that probiotic activity differently modulates peripheral immune parameters, in healthy volunteers and adults with atopic dermatitis. Probably, the underlying mechanism is partly associated with the existing differences in the composition and stability of the microbiota. Hence, different environmental conditions influence the host–bacterial crosstalk by competing for epithelial attachment sites. Possibly, different pathways of bacterial–enterocyte crosstalk may induce different immune responses in healthy subjects and allergic patients (Christensen et al., 2002; Perdigon et al., 2000; Roessler et al., 2007).

Studies in humans (Abrahamsson et al., 2007; Brouwer et al., 2006; Gruber et al., 2007; Kalliomaki et al., 2001; Kalliomaki et al., 2003; Osborn and Sinn, 2007; Rosenfeldt et al., 2003; Savilahti et al., 2008; Sisteck et al., 2006; Taylor et al., 2007; Viljanen et al., 2005) demonstrate that bacterial strains can have beneficial effects on allergies and may be considered probiotic, but that some probiotics can also induce unintended immunostimulation (Taylor et al., 2007).

It is evident that more research is needed to substantiate efficacy of bacterial strains meant as probiotics in allergy prevention. It could very well be that certain bacterial strains can be beneficial for human health in some disorders, while having adverse effects in others. Therefore the search for specific bacterial strains that decrease the onset and/or severity of food allergic responses remains crucial since not all probiotic strains exhibit the same properties and might even increase the onset and/or severity of food allergic responses.

Experimental animal models for allergy are useful as a first selection tool in order to select bacterial strains which could be effective in allergy prevention and can also provide more insight in the mechanisms involved. Subsequently, both efficacy and safety of these selected bacterial strains should be demonstrated in humans.

Novel biomarkers: gene expression profiles

A validated animal model could be important for identification of potential allergenic proteins in foods to which no prior exposure is apparent (hazard identification). In addition to classical measures of allergic sensitization, novel markers such as food allergy specific genes, for example, could in the future be of potential use as additional tools to screen for potential allergens in novel foods (**Chapter 5**). There is

an ongoing discussion concerning the ethical use of experimental animal models and a need for alternatives for animal models is eminent. In the search for alternatives to experimental animal models three categories (three R's) are considered: Reduction, Refinement and Replacement (Russell and Burch, 1959). Reduction refers to methods to reduce or minimize the number of animals used in experiments to acquire necessary information. Refinement refers to improved experimental techniques that eliminate or reduce animal stress and discomfort. Replacement refers to methods that allow a research goal to be achieved without conducting experiments on animals. In the context of this thesis, investigating gene expression profiles may especially be seen as a further refinement within the current model, by providing additional information on effects that may help to characterize allergic responses. All chapters of this thesis clearly indicate that in our experimental models for food allergy it is a necessity to investigate parameters at multiple levels of the food allergic process (some of these parameters are included in Figure 1).

In **Chapter 5** of this thesis the effects of oral administration of peanut on gene expression profiles in the mesenteric lymph nodes (MLNs) was investigated, with the aim to potentially find new biomarkers that could be of use to better predict allergenicity of food allergens (hazard identification). A second aim is obviously to broaden our knowledge base of the food allergic response (mechanistic research). Gene expression profiles were altered after three days of exposure to peanut, which was the earliest time-point included in these experiments. Furthermore, optimal regulation of gene expression was found after seven days of daily dosing with peanut, and this regulatory effect on gene expression was greatly diminished after 14 days of dosing to peanut. It is noteworthy that conventional parameters are often only (strongly) regulated at relatively late time-points: PE-specific IgE was optimal after 42 days of oral dosing with PE.

Peanut induced regulation of genes that were involved in cell proliferation or general immunological processes. However, the genes involved in immunological processes were not specific to the degree that they allowed us to discriminate between different types of immunity, i.e. these genes did not specifically indicate allergy. Further studies that strengthen this initial concept are needed to determine whether the effect at the gene expression level found in our BN rat model was limited to an immunologic response, or could also be indicative of an allergic response. Subsequent studies should therefore include immunologically active, but non-allergenic proteins alongside known allergens such as peanut. Such additional research will likely shed more light on specific genes and pathways indicative of food allergens and might thus be of value for both the mechanistic insight in the food allergic process as well as potential predictive screening purposes for potential allergens.

Further anticipating on the future possibilities, gene expression profiles could in a later phase be a very interesting tool to help elucidating the driving forces behind

the phenomenon that some animals and humans do develop allergy after exposure to an allergen while some animals and humans do not. We expect that assessing the discrepancy in the involvement of genes and pathways between these two immunological outcomes could play a key role in answering this question and thereby greatly increasing our knowledge on this topic. This knowledge in turn could help in the prevention and treatment of food allergy and could also supply us with some directions for different outcomes after exposure to allergens in other types of allergy/ allergy in general.

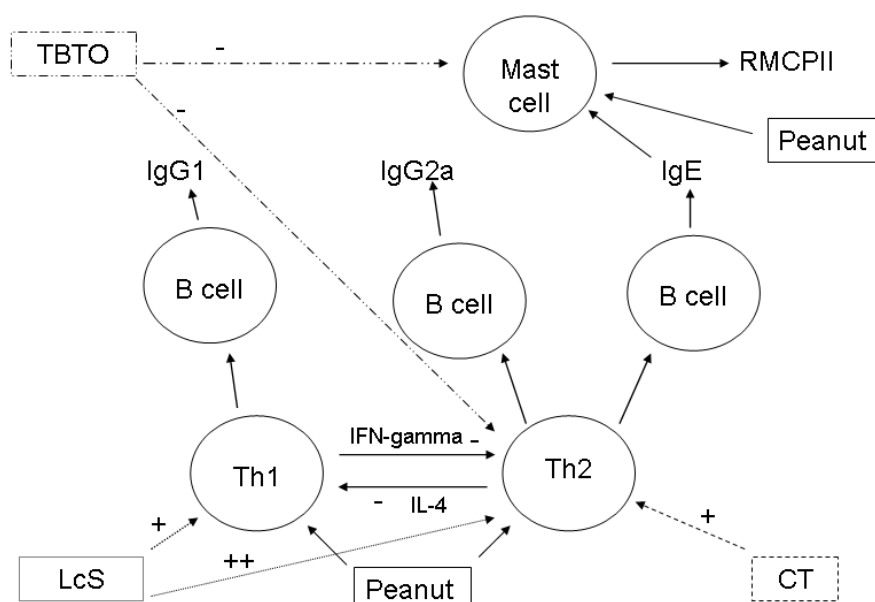


FIGURE 1. The effect of the (potential) immunomodulators: cholera toxin (CT), bis(tributyltin)oxide (TBTO) and *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) on parameters at various levels of the food allergic response to peanut.

Each immunomodulator's effect are displayed by arrows that indicate at which level they potentially modulate the food allergic response. Moreover, the direction of the effect at the aforementioned levels in the food allergic response are indicated by '-' (inhibition), '+' (stimulation) or '++' (very strong stimulation).

RMCP II is the abbreviation of "rat mast cell protease 2", which is a mast cell release product that can be released by degranulation after repeated exposure to the sensitized allergen.

REFERENCES

Abrahamsson, T.R., Jakobsson, T., Bottcher, M.F., Fredrikson, M., Jenmalm, M.C., Bjorksten, B., Oldaeus, G., 2007, Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1174-1180.

Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J.I., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J.I., Toyoda, M., 2001, Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *Immunol Lett.* 78, 1-5.

Atkinson, H.A., Johnson, I.T., Gee, J.M., Grigoriadou, F., Miller, K., 1996, Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization. *Food Chem.Toxicol.* 34, 27-32.

Atkinson, H.A., Miller, K., 1994, Assessment of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* 91, 281-288.

Broekaert, I.J., Walker, W.A., 2006, Probiotics and chronic disease. *J Clin Gastroenterol* 40, 270-274.

Brouwer, M.L., Wolt-Plompen, S.A., Dubois, A.E., van der Heide, S., Jansen, D.F., Hoijer, M.A., Kauffman, H.F., Duiverman, E.J., 2006, No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 36, 899-906.

Christensen, H.R., Frokiaer, H., Pestka, J.J., 2002, Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168, 171-178.

de Jonge, J.D., Knippels, L., Ezendam, J., Odink, J., Penninks, A.H., van Loveren, H., 2007, The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods* 41, 99-111.

de Waard, R., Claassen, E., Bokken, G.C., Buiting, B., Garssen, J., Vos, J.G., 2003, Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 59-65.

Dearman, R.J., Kimber, I., 2007, A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods* 41, 91-98.

Dearman, R.J., Kimber, I., 2009, Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy* 39, 458-468.

Ezendam, J., van Loveren, H., 2008, *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increased the duration of autoimmunity in rats and enhanced lung inflammation in mice. *Br J Nutr* 99, 83-90.

Gruber, C., Wendt, M., Sulser, C., Lau, S., Kulig, M., Wahn, U., Werfel, T., Niggemann, B., 2007, Randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus rhamnosus* GG as treatment of atopic dermatitis in infancy. *Allergy* 62, 1270-1276.

Ide, K., Hayakawa, H., Yagi, T., Sato, A., Koide, Y., Yoshida, A., Uchijima, M., Suda, T., Chida, K., Nakamura, H., 1999, Decreased expression of Th2 type cytokine mRNA contributes to the lack of allergic bronchial inflammation in aged rats. *J Immunol* 163, 396-402.

Jia, X., N., L., Wang, W., Wu, Y., 2004, [Determination of protein allergenicity--BN rat model] [Article in Chinese]. *Wei Sheng Yan Jiu* 33, 63-65.

Jia, X.D., Li, N., Wu, Y.N., Yang, X.G., 2005, Studies on BN rats model to determine the potential allergenicity of proteins from genetically modified foods. *World J Gastroenterol* 11, 5381-5384.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E., 2001, Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E., 2003, Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871.

Kalliomaki, M.A., Isolauri, E., 2004, Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 24, 739-752, viii.

Knippels, L.M., Houben, G.F., Spanhaak, S., Penninks, A.H., 1999a, An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* 19, 78-82.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., 2002, Assessment of protein allergenicity: studies in brown norway rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 964, 151-161.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., 2003, Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. *Environ.Health Perspect.* 111, 233-238.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Houben, G.F., 1998a, Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, 815-820.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Smit, J.J., Houben, G.F., 1999b, Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 161-169.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Spanhaak, S., Houben, G.F., 1998b, Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin. Exp. Allergy* 28, 368-375.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., van Meeteren, M., Houben, G.F., 1999c, Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem. Toxicol.* 37, 881-888.

Knippels, L.M., van der Kleij, H.P., Koppelman, S.J., Houben, G.F., Penninks, A.H., 2000, Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy* 55, 251-258.

Koppelman, S.J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A.C., Knol, E.F., 2004, Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin Exp Allergy* 34, 583-590.

Li, X.M., Schofield, B.H., Huang, C.K., Kleiner, G.I., Sampson, H.A., 1999, A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 103, 206-214.

Madsen, C., Pilegaard, K., 2003, No priming of the immune response in newborn brown norway rats dosed with ovalbumin in the mouth. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130, 66-72.

Matsuzaki, T., Chin, J., 2000, Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol.Cell Biol.* 78, 67-73.

Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1998, The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci.* 81, 48-53.

Mori, A., Yamamoto, K., Suko, M., Watanabe, N., Ito, M., Miyamoto, T., Okudaira, H., 1990, Interleukin-4 gene expression in high and low IgE responder mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92, 100-102.

Ogawa, T., Miura, S., Tsuzuki, Y., Ogino, T., Teramoto, K., Inamura, T., Watanabe, C., Hokari, R., Nagata, H., Ishii, H., 2003, Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MAdCAM-1. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 00183.

Osborn, D.A., Sinn, J.K., 2007, Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006475.

Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B., van der Straeten, M., 1979, The effect of age on IgE production in rats. *Immunology* 36, 145-149.

Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E.M., Nuutila, J., Salminen, S., 1998, Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28, 1474-1479.

Penninks, A.H., Knippels, L.M., 2001, Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol.Lett.* 120, 171-180.

Perdigon, G., Medina, M., Vintini, E., Valdez, J.C., 2000, Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 13, 141-150.

Pilegaard, K., Madsen, C., 2004, An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology* 196, 247-257.

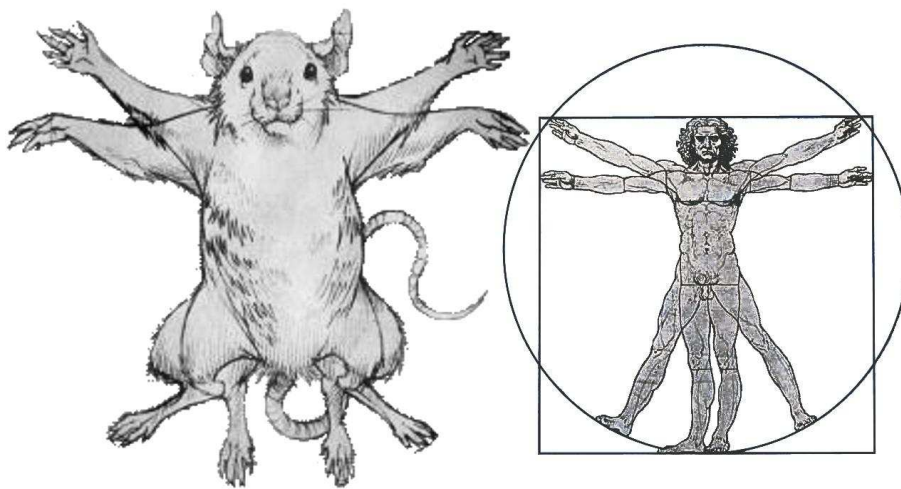
Prescott, S.L., Dunstan, J.A., Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., Richmond, P., 2005, Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 35, 1557-1564.

Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U.C., Schmidt, I., Jahreis, G., 2007, The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy*.

- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., Paerregaard, A., 2003, Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111, 389-395.
- Russell, W.M.S.I., Burch, R.L., 1959, *The Principles of Humane Experimental Technique*. Universities Federation for Animal Welfare Wheathampstead, England (reprinted in 1992).
- Savilahti, E., Kuitunen, M., Vaarala, O., 2008, Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8, 243-248.
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., Kaminogawa, S., 1998, *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 278-287.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., Habu, S., Hachimura, S., Kaminogawa, S., 2002, *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 32, 563-570.
- Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., Stanley, T., Fitzharris, P., Crane, J., 2006, Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clin Exp Allergy* 36, 629-633.
- Taylor, A.L., Dunstan, J.A., Prescott, S.L., 2007, Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: A randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119, 184-191.
- van der Meide, P.H., Groenestein, R.J., de Labie, M.C., Aten, J., Weening, J.J., 1995, Susceptibility to mercuric chloride-induced glomerulonephritis is age-dependent: study of the role of IFN-gamma. *Cell Immunol* 162, 131-137.
- van Wijk, F., Hartgring, S., Koppelman, S.J., Pieters, R., Knippels, L.M., 2004, Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clin Exp Allergy* 34, 1422-1428.
- van Wijk, F., Nierkens, S., Hassing, I., Feijen, M., Koppelman, S.J., de Jong, G.A., Pieters, R., Knippels, L.M., 2005, The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicol Sci* 86, 333-341.
- Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M., 2005, Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60, 494-500.
- Yamanishi, R., Yusa, I., Bando, N., Terao, J., 2003, Adjuvant activity of alum in inducing antigen specific IgE antibodies in BALB/c mice: a reevaluation. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 166-169.

Chapter 7

Samenvatting en algemene discussie



HOOFDBEVINDINGEN

Voedselallergie is een probleem in de samenleving vanwege haar relatief hoge prevalentie, haar potentieel fatale symptomen en haar impact op het sociale leven. In het ontstaan van voedselallergie spelen verschillende factoren een rol, waarvan de meest belangrijke genetische en omgevingsfactoren zijn. Daarnaast is het mogelijk dat consumenten blootgesteld worden aan nieuwe allergenen, die aan de voedselketen kunnen worden toegevoegd door ontwikkelingen op het gebied van de voeding, zoals genetisch gemodificeerde voeding. Op dit moment is de risico-evaluatie op dit gebied nog in ontwikkeling en zijn er nog geen gevalideerde diermodellen voorhanden om voedselallergie te bestuderen. Dergelijke diermodellen helpen niet alleen om de invloed van externe factoren op de ontwikkeling van voedselallergie beter te begrijpen, maar kunnen ook van nut zijn bij de identificatie van nieuwe voedselallergenen in bijvoorbeeld genetisch gemodificeerde voeding.

In dit proefschrift wordt de verdere ontwikkeling van een experimenteel diermodel voor voedselallergie beschreven. Dit model werd gebruikt om de effecten van immunomodulerende bestanddelen zoals aanwezig kunnen zijn in voeding op de voedselallergische respons te bepalen. Tevens is dit model toegepast om vast te stellen of door middel van het bepalen van genexpressie profielen nieuwe biomarkers konden worden gedetecteerd.

De hoofdbevindingen van dit proefschrift kunnen worden samengevat als:

- Na orale inname van pinda extract (PE) waren Brown Norway (BN) ratten allergisch gesensibiliseerd, mits de ratten 3 generaties gevoed werden op een pinda- en soja-vrij dieet (**Hoofdstuk 2**). Soja eiwitten en pinda eiwitten vertonen kruisreactiviteit, en blootstelling aan soja kan tolerantie veroorzaken tegen zowel soja als pinda en als zodanig pinda sensibilisatie beïnvloeden.
- De meest notoire allergenen die in pinda's voorkomen zijn drie suikereiwit moleculen genaamd '*Ara h1*', '*Ara h2*' en '*Ara h3*'. Ratten die oraal gesensibiliseerd werden met PE herkenden de belangrijke pinda allergenen: *Ara h1-3*, terwijl intraperitoneaal (i.p.) gesensibiliseerde ratten alleen *Ara h1* en *Ara h2* herkenden (**Hoofdstuk 2**). Deze vinding onderstreept het belang van de blootstellingsroute in de herkenning van allergenen. In tegenstelling tot i.p. dosering, leidt orale dosering tot blootstelling van zowel de orale mucosa als de darm mucosa inclusief de bijbehorende immuunsystemen, wat mogelijk in de inductie van IgE responsen en/of orale tolerantie tegen verschillende eiwitten resulteert in oraal blootgestelde ratten ten opzichte van ratten die i.p. blootgesteld zijn.
- Cholera toxine (CT) versterkte de allergische sensibilisatie slechts in beperkte mate.

- De immunosuppressieve stof bis(tributyltin)oxide (TBTO) onderdrukte voedselallergie gericht tegen zowel pinda als ovalbumine (een allergeen aanwezig in kippeneiwit) en deed dit op meerdere niveaus van de voedsel-allergische respons (**Hoofdstuk 3**)
- De bacteriële stam *Lactobacillus casei* Shirota (LcS), waarvan geclaimd wordt dat deze een effect op allergie heeft, had geen effect op de allergische respons geïnduceerd door pinda. De hypothese was dat LcS de Th1/Th2 balans richting Th1 dominantie zou schuiven en zo de Th2-gemedieerde allergische respons zou dempen. Echter, LcS induceerde een Th2 dominantie, zowel op het niveau van cytokine productie als op het niveau van immunoglobuline productie (**Hoofdstuk 4**).
- **Hoofdstuk 5** beschrijft de effecten van orale blootstelling aan PE op genexpressie profielen. Na inname van PE werden tijds- en dosisafhankelijke veranderingen in genexpressie gevonden. De belangrijkste gereguleerde “pathway” (in deze context een verzameling van aan elkaar gelieerde responsen binnen een bepaald proces) was die van de celdeling. Daarnaast werden ook immunologische processen geactiveerd.

KNAAGDIERMODELLEN VOOR VOEDSELALLERGIE: RELEVANTE FACTOREN

De effecten van (potentiële) immunomodulerende bestanddelen van en contaminanten uit voeding op de pinda-allergische respons zijn onderzocht door middel van bepaling van een spectrum aan conventionele parameters in het BN model. De resultaten van deze studies tonen aan dat het bepalen van meerdere parameters op verschillende niveaus van de voedselallergische respons waarde toevoegt aan de interpretatie van het effect. Diermodellen voor voedselallergie kunnen gebruikt worden in onderzoek naar de effecten van immuunmodulerende verbindingen, bij het bestuderen van mechanismen en voor het identificeren van potentiële allergenen in bijvoorbeeld genetisch gemodificeerde voeding.

Keuze van het diermodel: species en stam

Verschillende diermodellen voor voedselallergie zijn op dit moment in gebruik, inclusief modellen in muizen, ratten, honden en zwijnen (Dearman and Kimber, 2009). We bespreken hier kort de twee meest populaire diersoorten die in deze onderzoekstak worden gebruikt: knaagdiermodellen in de muis en in de rat.

De muis is de diersoort, die op dit moment het meest wordt toegepast met betrekking tot de ontwikkeling van een diermodel voor voedselallergie. Deze voorkeur wordt voornamelijk gevoed door de beschikbaarheid van verscheidene immunologische en moleculaire reagentia, inclusief transgene dieren waarin bepaalde interessante genen tot overexpressie gebracht zijn, danwel buiten werking zijn gesteld. Een belangrijk voordeel in studies naar IgE-antilichaam responsen is de beschikbaarheid

van inteelt en congene hoge IgE reagerende muizenstammen, zoals de hoge IgE reagerende BALB/c stam (Dearman and Kimber, 2007; Mori et al., 1990; Yamanishi et al., 2003) en de C3H/HeJ strain (Li et al., 1999; van Wijk et al., 2004). Als zodanig hebben deze stammen analogie met het ontvankelijke (atopische) menselijke fenotype dat de inclinatie heeft om IgE-gemedieerde ziekte te ontwikkelen, en faciliteren zodoende de identificatie van potentiële allergene eiwitten. Om muizen te sensibiliseren wordt over het algemeen i.p. dosering toegepast, al dan niet in de aanwezigheid van een adjuvant. Een andere methode die veel wordt toegepast is oraal doseren met het allergeen en een adjuvant.

Naast muizen worden ook ratten gebruikt als experimenteel model en dat vooral de BN rat (Akiyama et al., 2001; de Jonge et al., 2007; Jia et al., 2005; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1998b; Pilegaard and Madsen, 2004). De BN rat heeft als specifieke eigenschap dat Th2 responsen makkelijk op te wekken zijn en dat hij grote hoeveelheden antilichamen, vooral IgE, kan aanmaken. Na het oraal toedienen van voedselallergenen worden reacties waargenomen, zoals toename in de darmpermeabiliteit en veranderingen in bloeddruk en respiratoire functie (Knippels et al., 1999b), die ook humaan klinisch relevant zijn. Het profiel aan allergenen dat herkend wordt door BN ratten lijkt vergelijkbaar met het profiel dat door allergische patiënten wordt herkend (Knippels and Penninks, 2003). BN ratten kunnen oraal worden gesensibiliseerd zonder gebruik te maken van adjuvantia (Akiyama et al., 2001; de Jonge et al., 2007; Jia et al., 2005; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1998b; Pilegaard and Madsen, 2004). Een bijkomend voordeel is dat ratten door hun grootte makkelijk te gebruiken zijn voor kinetiekstudies, zoals het monitoren van antilichaamresponsen over de tijd. Belangrijk is tevens dat ratten, in tegenstelling tot muizen, routinematig in toxiciteitsstudies gebruikt worden, waardoor een dergelijk model ook makkelijker hierin geïntegreerd zou kunnen worden.

Blootstelling aan het allergeen of kruisreactieve eiwitten via het dieet

Een belangrijk aspect om te beschouwen bij het ontwikkelen van een model voor voedselallergie is onbedoelde voorblootstelling (de reeds opgetrede blootstelling voorafgaande aan de daadwerkelijke proef), middels het dieet, van de proefdieren en de voorouders daarvan aan het allergeen van interesse. Blootstelling van de ouderdieren aan het te testen antigeen beïnvloedt de uitkomst van orale sensibilisatie, om dit te voorkomen dienen studies met het nageslacht worden voorafgegaan door ten minste twee generaties gefokt op een diet dat vrij is van het te onderzoeken antigeen. Zo beschreven Knippels *et al.* (Knippels et al., 1998a) bijvoorbeeld dat sojaspecifieke IgG antilichamen niet meer gedetecteerd konden worden indien twee generaties lang op soja-vrij dieet werd gefokt. Diëten voor knaagdieren kunnen eiwitten bevatten die ofwel identiek zijn aan de te onderzoeken eiwitten, danwel kruisreactiviteit vertonen met de te onderzoeken eiwitten. Het is duidelijk dat voor-

blootstelling van de proefdieren aan de te onderzoeken eiwitten invloed uitoefent op de status van sensibilisatie en/of tot orale tolerantie leidt. Dit proefschrift toont aan dat exclusie van dergelijke eiwitten in het dieet van de proefdieren gedurende een aantal opeenvolgende generaties een vereiste is voor het juist functioneren van het model (**Hoofdstuk 2**). Deze resultaten bevestigen het belang van dieetcontrole, zoals eerder is aangetoond (Knippels et al, 1998a, Brix et al. 2005, Christensen et al 2003, 2004).

Blootstellingsroute

Mensen worden voornamelijk via het dieet blootgesteld aan voedselallergenen. Eenmaal in de darmen aangekomen worden de eiwitten verteerd door het spijsverteringskanaal, waarbij verschillende antigene structuren ontstaan. Deze worden gepresenteerd aan het immuunsysteem van de darmen. Een andere blootstellingsroute zal ook kunnen leiden tot een andere presentatie van de antigene structuren aan het immuunsysteem. Er zijn diersmodellen beschreven die gebruik maken van i.p. sensibilisatie. Het is mogelijk om op deze manier allergische responsen te induceren. In **Hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat na zowel i.p. als orale blootstelling allergische responsen worden geïnduceerd. Echter, de allergenen die herkend worden verschillen. Het allergeen *Ara h1* werd in beide modellen herkend, maar voor *Ara h2* en *Ara h3* werden verschillen gevonden. De specifieke IgG2a respons gericht tegen *Ara h2* in ratten die i.p. blootgesteld waren was twee keer zo hoog als in de oraal blootgestelde ratten. Een specifieke IgG2a respons tegen *Ara h3* werd geheel niet gevonden in i.p. behandelde dieren, maar werd in 50% van de oraal behandelde ratten wel aangetoond. Na orale blootstelling, kunnen eiwitten in het maag-darmkanaal verteerd worden, wat vervolgens weer kan leiden tot de presentatie van andere antigene structuren in vergelijking tot de situatie na i.p. blootstelling waarbij de verteringsstap ontbreekt. In tegenstelling tot i.p. dosering, zijn bij orale dosering zowel de orale slijmvliezen als de darmen betrokken (Madsen and Pilegaard, 2003), inclusief de bijbehorende immuunsystemen, wat vervolgens mogelijk kan leiden tot de inductie van IgE responsen tegen andere allergenen dan bij i.p. blootgestelde ratten het geval zou zijn.

De data zoals gepresenteerd in **Hoofdstuk 2** attenderen ons erop dat de orale sensibilisatie ten opzichte van de i.p. sensibilisatie van BN ratten, een nauwkeurigere reflectie oplevert van de responsen in patiënten met pinda-allergie, waar specifieke IgE responsen tegen *Ara h1-3* worden waargenomen (Koppelman et al., 2004).

Gebruik van adjuvantia

In het merendeel van de diersmodellen, zowel i.p. als oraal blootgesteld, worden adjuvantia toegepast om ervoor te zorgen dat de dieren succesvol gesensibiliseerd kunnen worden tegen het gewenste eiwit. Het adjuvant heeft als doel om de allergische respons te versterken. Mogelijke nadelen hiervan zijn dat dergelijke adjuvantia

de complexiteit van het model kunnen verhogen en dat de manier van sensibilisatie mogelijk verschilt van de normale humane situatie. Hoewel het gebruik van een adjuvant de sensitiviteit kan verhogen, kan dit ten koste gaan van de selectiviteit. In BN ratten kan zonder gebruik van adjuvantia een voedselallergische respons geïnduceerd worden na orale blootstelling. In dit BN rat model kan bovendien onderscheid worden gemaakt tussen sterke allergenen (ovalbumine), zwakke allergenen (serum albumine afkomstig van een rund) en eiwitten die niet allergeen zijn (aardappel zure fosfatase) (Jia et al., 2005). Zelfs zonder gebruik van een adjuvant kan orale blootstelling resulteren in 100% IgE-responders, als zorgvuldig aan randvoorwaarden zoals het gebruik van allergeen vrije diëten wordt voldaan (**Hoofdstuk 2**).

Andere factoren

Naast bovengenoemde, spelen andere factoren ook een rol in dit model. Pilegaard en Madsen (Pilegaard and Madsen, 2004) demonstreerden dat vrouwelijke BN ratten gevoeliger waren voor kippeneiwit allergenen dan mannelijke exemplaren. Na orale blootstelling waren er meer vrouwelijke ratten met een positieve IgE respons (38-75%) dan bij mannelijke BN ratten (13-38%) het geval was. Veroudering leidt bij BN ratten tot verminderde Th2-dominantie (Ide et al., 1999; van der Meide et al., 1995), waardoor het moeilijk wordt om een allergische respons te induceren (Ide et al., 1999; Pauwels et al., 1979). Om deze redenen hebben wij jonge (3-4 wk oude) vrouwelijke ratten gebruikt in onze studies.

De voeding zelf kan ook van invloed zijn, omdat sommige voedselbestanddelen in potentie de voedselallergische respons kunnen veranderen. De matrix waarin het eiwit in contact komt met het immuunsysteem is van belang om de allergeniciteit van het eiwit in het experimentele model voor voedselallergie te kunnen bepalen (van Wijk et al., 2005).

In het ideale model vertonen de proefdieren, naast sensibilisatie zoals gemeten door allergeenspecifieke IgE responsen, reacties die overeenkomen met menselijke reacties na een acute blootstelling aan (een hoge dosering van) het allergeen. Verder moet het proefdiermodel relatief makkelijk uitvoerbaar en reproduceerbaar zijn (Penninks and Knippels, 2001). Hoewel al deze factoren moeilijk te vatten zijn in één enkel model, lijkt het orale voedselallergiemodel in BN ratten mogelijk zoals gepresenteerd in deze thesis een geschikt model om de allergeniciteit van voedselallergenen in mensen te bestuderen. Dit gedachtengoed vind ook steun middels eerdere publicaties betreffende studies in BN ratten (Atkinson et al., 1996; Atkinson and Miller, 1994; Jia et al., 2004; Jia et al., 2005; Knippels et al., 1999a; Knippels and Penninks, 2002; Knippels et al., 1999b; Knippels et al., 1998b; Knippels et al., 1999c; Knippels et al., 2000; Ogawa et al., 2003; Pilegaard and Madsen, 2004).

BEPERKINGEN VAN DE BN RAT ALS EEN EXPERIMENTEEL MODEL VOOR VOEDSEL-ALLERGIE

Hoewel ons BN rat model voor voedselallergie vele voordelen kent voor gebruik als een experimenteel model, heeft ook dit model nadelen voor risico-inschatting:

1. de BN rat is een inteeltstam: alhoewel de hoge inteeltcoëfficiënt de waarschijnlijkheid verhoogt dat de immuunreactie van een BN rat overeenkomt met die van een andere BN rat (en als gevolg daarvan het benodigde aantal dieren in elke blootstellinggroep helpt verminderen), is de keerzijde van dit effect dat de BN rat als een model niet de brede genetische variatie heeft die wel in atopische mensen voorkomt;
2. afwezigheid van anafylactische reacties: dit verschilt met de sterke anafylactische reacties die in menselijke patiënten voorkomen. Dit verschil tussen BN ratten en atopische patiënten is van speciaal belang aangezien anafylaxis zowel levensbedreigend is als een grote impact heeft op het leven van voedselallergische patiënten in algemenere zin;
3. beperking tot één geslacht: het gebruik van vrouwelijke BN ratten, zoals toegepast in de door ons uitgevoerde verdere doorontwikkeling van de BN rat als model voor voedselallergie, verhoogt weliswaar de sensitiviteit tegen de te onderzoeken antigenen (en als gevolg daarvan een vermindering in het benodigde aantal dieren in elke blootstellinggroep), maar vertegenwoordigt aan de andere kant niet de humane situatie waarbij atopische patiënten beide geslachten omvatten; en
4. mogelijke onderschatting van het effect van immunostimulatoren: in **Hoofdstuk 2** werd beschreven dat het adjuvant CT niet in staat was om de kracht van de allergische reactie tegen pinda eiwitten substantieel te verhogen, dit kan betekenen dat in het hier gebruikte experimentele model al optimaal immuunreacties worden geïnduceerd, en het model daardoor suboptimaal is om het effect van dergelijke immunostimulatoren op de voedselallergische respons te bestuderen.

GEBRUIK VAN EEN BN RAT MODEL VOOR VOEDSELALLERGIE

De eerste regel van de toxicologie is dat alle stoffen een effect hebben, maar dat de dosering bepaalt of het effect wenselijk of onwenselijk is (Paracelsus (1493-1541); “Dosis sola facit venenum” (alleen de dosis bepaalt of iets een vergif is)). Zoals eerder aangegeven, spelen naast de dosis ook andere factoren, inclusief omgevingsfactoren en andere voedselcomponenten in het voedsel buiten het allergeen zelf, een rol in de het uiteindelijke effect op (het ontstaan van) voedselallergie. Er is een verschil tussen “hazards” (het potentieel om een negatief effect te veroorzaken) en risico’s (het negatieve potentieel gekoppeld aan de kans dat deze effecten ook daadwerkelijk optreden). Binnen voedselallergie kunnen gevalideerde diermodellen voor voed-

selallergie naast hun toepassing voor “hazard” identificatie, ook gebruikt worden voor de inschatting van risico’s en dan met name om risicobeïnvloedende factoren, zoals omgevingsfactoren of voedselcomponenten in het voedsel buiten het allergeen zelf, op te pikken.

Immunodulerende effecten onderzocht met het BN rat model voor voedselallergie

De effecten van drie verschillende immunomodulatoren werden voor dit proefschrift bestudeerd. **Hoofdstuk 2** beschrijft het effect van het mucosale adjuvant CT. Het adjuvant CT was in dit model slechts in beperkte mate effectief in het versterken van de voedselallergische respons. CT adjuvatie verhoogde wel de kracht van de IgE respons en in mindere mate die van de IgG1 respons, maar niet die van de IgG2a respons, niet de hoogte van de rat mest cel protease 2 (RMCP II) concentraties, en ook niet de hoeveelheid granulocyten of het niveau van de cytokines. Deze resultaten impliceren dat in ratten die gefokt zijn op een soja- en pinda-vrij dieet, orale sensibilisatie mogelijk reeds dicht tegen een optimaal resultaat aan zit en dat CT daarom de sensitiviteit van het model niet aanzienlijk kon verhogen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de invloed van de in de voedselketen voorkomende contaminant, de immunosuppressieve verbinding TBTO, op de ontwikkeling van voedselallergie tegen pinda of ovalbumine in BN ratten. Blootstelling aan TBTO resulteerde niet alleen in afgenomen algemene immunologische parameters, maar had tevens een onderdrukkend effect op allergische parameters. TBTO verminderde de productie van allergeenspecifieke Th2 cytokines door miltcellen, de allergeenspecifieke IgE niveaus, de hoeveelheden eosinofiele en basofiele granulocyten in het bloed en de productie van mest cel protease II na een orale acute hoge dosering van het allergeen.

Na het onderzoeken van de effecten van de immunosuppressieve verbinding (TBTO) en de immunostimulerende verbinding (CT), werd het effect van *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) op de voedselallergische respons tegen pinda onderzocht (**Hoofdstuk 4**). Figuur 1 toont een versimpeld overzicht van de interacties van de immunomodulatoren CT en TBTO met het immuunsysteem, en toont ook waar *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) invloed uitoefent. We veronderstelden een remmend effect van deze bacteriële stam, vanwege haar effect op Th1 immuniteit. LcS verminderde de voedselallergische respons tegen pinda niet. Integendeel, in ons allergiemodel tegen pinda (**Hoofdstuk 4**) verschoof LcS de Th1/Th2 balans in de richting van Th2 dominantie op zowel het niveau van de productie van cytokines als op het niveau van de productie van de antilichamen IgG1 en IgG2a. Het meest uitgesproken effect van LcS dat in deze studie werd gevonden was haar effect op de productie van IL-4 door milt- dan wel mesenterische lymfeklier (MLK) cellen. LcS was tevens in staat om vroege pinda extract (PE)-specifieke IgE niveaus en PE-specifieke IgG niveaus te stimuleren. De resultaten van onze studie staan in contrast met de resultaten uit drie dierstudies met knaagdieren die een afname van IgE beschrijven (Matsuzaki

and Chin, 2000; Matsuzaki et al., 1998; Shida et al., 2002). In een respiratoir allergie model had LcS geen effect op IgE (Ezendam and van Loveren, 2008). LcS verminderde ook de *in vitro* IgE productie in miltcellen van aan OVA blootgestelde muizen (Shida et al., 1998).

Wat betekenen deze resultaten voor de menselijke situatie? Allereerst dient de kanttekening gemaakt te worden dat de effecten van probiotica afhangen van stam, viabiliteit, dosering, duur en wijze van de behandeling, en tijdstip van (prenatale) blootstelling (Broekaert and Walker, 2006; de Waard et al., 2003; Kalliomaki and Isolauri, 2004; Prescott et al., 2005; Savilahti et al., 2008). Daarnaast is aangetoond dat de effecten die bacteriële stammen op het immuunsysteem kunnen uitoefenen afhangen van de individuele immunologische status (Pelto et al., 1998; Roessler et al., 2007). Pelto *et al.* (Pelto et al., 1998) lieten zien dat inname van *Lactobacillus* GG (LGG) resulteerde in een toegenomen expressie van fagocytose receptoren in gezonde personen, terwijl LGG-supplementatie in personen die overgevoelig zijn tegen melk een onderdrukte expressie van deze receptoren veroorzaakte. Roessler *et al.* (Roessler et al., 2007) claimen dat perifere parameters verschillend beïnvloed worden door probiotica in gezonde volwassen vrijwilligers ten opzichte van volwassenen met atopische dermatitis. Waarschijnlijk is het onderliggende mechanisme gedeeltelijk geassocieerd met het bestaande verschil in de competitie en de stabiliteit van microbiota. De gastheer lijkt van invloed te zijn op de effecten van bacteriën, bijvoorbeeld door competitie voor epitheliale bindingsplekken. Mogelijk spelen in gezonde personen ten opzichte van allergische patiënten andere factoren een rol die van invloed zijn op de effecten van probiotica (Christensen et al., 2002; Perdigon et al., 2000; Roessler et al., 2007).

Onderzoek in proefpersonen (Abrahamsson et al., 2007; Brouwer et al., 2006; Gruber et al., 2007; Kalliomaki et al., 2001; Kalliomaki et al., 2003; Osborn and Sinn, 2007; Rosenfeldt et al., 2003; Savilahti et al., 2008; Sistik et al., 2006; Taylor et al., 2007; Viljanen et al., 2005) toont aan dat bacteriële stammen verschillende effecten kunnen uitoefenen op allergieën en zodoende probiotisch werken, terwijl sommige probiotica ook ongewenste immunostimulatie kunnen veroorzaken (Taylor et al., 2007).

Het is evident dat meer onderzoek nodig is om de preventieve effecten van probiotica op allergieën te onderbouwen. Het lijkt waarschijnlijk dat bepaalde bacteriestammen een gunstige uitwerking kunnen hebben op de gezondheid van patiënten met bepaalde aandoeningen, terwijl deze zelfde stammen mogelijk negatieve effecten kunnen hebben bij patiënten met andere ziektebeelden. Het blijft daarom van belang om de zoektocht te vervolgen naar specifieke bacteriestammen die het ontwikkelen en/of de hevigheid van voedselallergische responsen kunnen verminderen, temeer daar niet alle probiotische stammen dezelfde eigenschappen verto-

nen en zelfs de ontwikkeling en/of de hevigheid van voedselallergische responsen kunnen verhogen.

Experimentele diermodellen voor allergie zijn bruikbaar als een eerste screening om bacteriestammen te selecteren die potentieel effectieve probiotica kunnen zijn in preventie of behandeling van allergie. In deze diermodellen kunnen ook onderliggende mechanismen bestudeerd worden. Vervolgens zullen werkzaamheid en veiligheid in humane studies moeten worden vastgesteld.

Nieuwe biomarkers: genexpressie profielen

Een gevalideerd diermodel kan van belang zijn voor de identificatie van eiwitten die in potentie allergenen kunnen zijn in voedsel waaraan nog geen eerdere blootstelling heeft opgetreden (“hazard” identificatie). Ter aanvulling van de klassieke metingen van allergische sensibilisatie, zou in de toekomst een potentiële rol weggelegd kunnen zijn voor nieuwe markers, zoals bijvoorbeeld allergiespecifieke genen (**Hoofdstuk 5**). Er vindt een doorlopende discussie plaats aangaande het ethisch verantwoord gebruik van proefdiermodellen en er is een behoefte aan alternatieven voor proefdiermodellen. In de zoektocht naar alternatieven voor diermodellen worden drie categorieën (de 3 V’s) in beschouwing genomen, te weten: Vermindering, Verfijning en Vervanging (Russell and Burch, 1959). Vermindering refereert aan methoden om het aantal dieren dat in deze experimenten noodzakelijk is te verminderen of minimaliseren. Verfijning refereert aan verbeterde experimentele technieken die stress en ongemak in proefdieren elimineren of verminderen. Vervanging refereert aan methoden, die onderzoekers in staat stellen een onderzoeksdoel te realiseren zonder gebruik te hoeven maken van proefdierexperimenten. In de context van dit proefschrift, kan onderzoek van het gebruik van genexpressie profielen vooral gezien worden als een verdere verfijning binnen het huidige model. Alle hoofdstukken van dit proefschrift tonen duidelijk aan dat in ons experimenteel model voor voedselallergie, de noodzaak bestaat om parameters op verschillende niveaus van het voedselallergische proces te onderzoeken (enkele van deze parameters zijn verwerkt in Figuur 1).

In **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift worden de effecten van orale toediening van pinda op genexpressie profielen van MLK beschreven. Na drie dagen blootstelling aan pinda werden al veranderde genexpressie profielen waargenomen, dit is het eerste tijdstip dat was meegenomen. Optimale regulatie op het niveau van genexpressie werd gevonden na zeven dagen blootstelling en deze effecten waren na 14 dagen sterk verminderd. In deze context is het vermeldenswaardig dat conventionele parameters slechts (sterk) gereguleerd zijn op relatief late tijdstippen: zo was PE-specifieke IgE optimaal na 42 dagen van orale dosering met PE.

Blootstelling aan pinda induceerde regulatie van genen die betrokken waren bij celdeling of bij algemene immunologische processen. Daarnaast werden ook immunologische processen geactiveerd. De genen die betrokken waren bij immunologi-

sche processen waren niet specifiek indicatief voor allergie. Aanvullende studies om deze eerste resultaten te versterken zijn nodig om te bepalen of het effect op het niveau van genexpressie zoals in ons BN rat model werd gevonden, beperkt was tot een immunologische respons of tevens indicatief kan zijn voor een allergische respons. Vervolgstudies moeten daarom immunologisch actieve, maar niet-allergene eiwitten naast bekende allergenen zoals pinda meenemen. Dergelijk additioneel onderzoek zal waarschijnlijk meer informatie kunnen verschaffen over de specifieke genen en “pathways” (in dit geval in genen met onderlinge afhankelijkheid), die indicatief zijn voor voedselallergenen en als zodanig van waarde kunnen zijn voor het mechanistisch inzicht in het voedselallergische proces, en heeft daarnaast een mogelijke toepassing in het voorspellend onderzoek om potentiële allergenen door te lichten.

Verder anticiperend op toekomstige mogelijkheden, kunnen genexpressie profielen in een later stadium mogelijk een erg interessant gereedschap zijn om vast te stellen waarom sommige dieren en mensen wel een allergie ontwikkelen na blootstelling aan een allergeen terwijl andere dieren en mensen na blootgesteld te zijn aan hetzelfde allergeen geen allergie ontwikkelen. We verwachten dat het inschatten van de discrepantie op het niveau van betrokken genen en “pathways” tussen deze twee immunologische uitkomsten een sleutelrol in het beantwoorden van deze vraag kan spelen en daarmee onze kennis op dit onderwerp aanzienlijk kan vergroten. Deze kennis kan vervolgens weer een hulp zijn in de preventie en behandeling van voedselallergie en ons ook van wat aanwijzingen voorzien voor verschillende immunologische uitkomsten na blootstelling aan allergenen in andere soorten van allergie/ allergie in het algemeen.

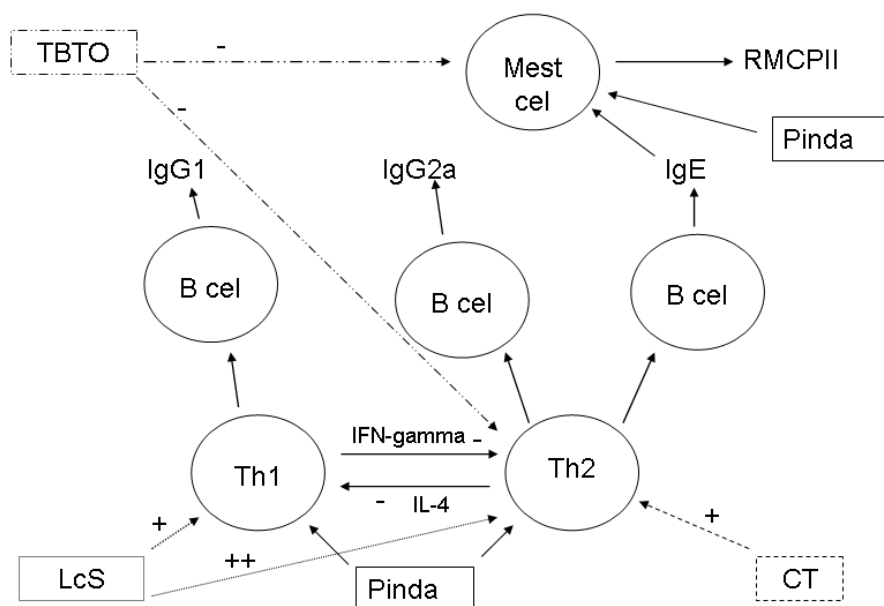


FIGURE 1. Het effect van de immunomodulatoren: cholera toxine (CT), bis(tributyltin)oxide (TBTO) en *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) op parameters op verschillende niveaus binnen de voedselallergische respons tegen pinda.

Het potentiële effect dat elke immunomodulator uitoefent staat afgebeeld door middel van pijlen, die het niveau aangeven waarop de modulatie van de voedselallergische respons geschiedt. De richting van het effect op de voedselallergische respons is aangegeven door '-' (inhibitie), '+' (stimulatie) of '++' (erg sterke stimulatie).

RMCP II is de afkorting voor "rat mest cel protease 2", een mest cel product dat vrijkomt tijdens het degranulatieproces na herhaalde blootstelling aan het allergeen waartegen sensibilisatie heeft plaatsgevonden.

REFERENTIES

- Abrahamsson, T.R., Jakobsson, T., Bottcher, M.F., Fredrikson, M., Jenmalm, M.C., Bjorksten, B., Oldaeus, G., 2007, Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1174-1180.
- Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J.I., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J.I., Toyoda, M., 2001, Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. *Immunol Lett.* 78, 1-5.
- Atkinson, H.A., Johnson, I.T., Gee, J.M., Grigoriadou, F., Miller, K., 1996, Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization. *Food Chem.Toxicol.* 34, 27-32.
- Atkinson, H.A., Miller, K., 1994, Assessment of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* 91, 281-288.
- Brix, S., Christensen, H.R., Barkholt, V., Frokiaer, H., 2005, Effect of maternal dietary cow's milk on the immune response to beta-lactoglobulin in the offspring: a four-generation study in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 136, 250-257.
- Broekaert, I.J., Walker, W.A., 2006, Probiotics and chronic disease. *J Clin Gastroenterol* 40, 270-274.

Brouwer, M.L., Wolt-Plompen, S.A., Dubois, A.E., van der Heide, S., Jansen, D.F., Hoijer, M.A., Kauffman, H.F., Duiverman, E.J., 2006, No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 36, 899-906.

Christensen, H.R., Frokiaer, H., Pestka, J.J., 2002, Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168, 171-178.

Christensen, H.R., Brix, S., Frokiaer, H., 2004, Immune response in mice to ingested soya protein: antibody production, oral tolerance and maternal transfer. *Br J Nutr* 91, 725-732.

Christensen, H.R., Kjaer, T.M., Frokiaer, H., 2003, Low-dose oral tolerance due to antigen in the diet suppresses differentially the cholera toxin-adjuvanted IgE, IgA and IgG response. *Int Arch Allergy Immunol* 132, 248-257.

de Jonge, J.D., Knippels, L., Ezendam, J., Odink, J., Penninks, A.H., van Loveren, H., 2007, The importance of dietary control in the development of a peanut allergy model in Brown Norway rats. *Methods* 41, 99-111.

de Waard, R., Claassen, E., Bokken, G.C., Buiting, B., Garssen, J., Vos, J.G., 2003, Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 59-65.

Dearman, R.J., Kimber, I., 2007, A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods* 41, 91-98.

Dearman, R.J., Kimber, I., 2009, Animal models of protein allergenicity: potential benefits, pitfalls and challenges. *Clin Exp Allergy* 39, 458-468.

Ezendam, J., van Loveren, H., 2008, *Lactobacillus casei* Shirota administered during lactation increased the duration of autoimmunity in rats and enhanced lung inflammation in mice. *Br J Nutr* 99, 83-90.

Gruber, C., Wendt, M., Sulser, C., Lau, S., Kulig, M., Wahn, U., Werfel, T., Niggemann, B., 2007, Randomized, placebo-controlled trial of *Lactobacillus rhamnosus* GG as treatment of atopic dermatitis in infancy. *Allergy* 62, 1270-1276.

Ide, K., Hayakawa, H., Yagi, T., Sato, A., Koide, Y., Yoshida, A., Uchijima, M., Suda, T., Chida, K., Nakamura, H., 1999, Decreased expression of Th2 type cytokine mRNA contributes to the lack of allergic bronchial inflammation in aged rats. *J Immunol* 163, 396-402.

Jia, X., N., L., Wang, W., Wu, Y., 2004, [Determination of protein allergenicity--BN rat model] [Article in Chinese]. *Wei Sheng Yan Jiu* 33, 63-65.

Jia, X.D., Li, N., Wu, Y.N., Yang, X.G., 2005, Studies on BN rats model to determine the potential allergenicity of proteins from genetically modified foods. *World J Gastroenterol* 11, 5381-5384.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E., 2001, Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Poussa, T., Arvilommi, H., Isolauri, E., 2003, Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871.

Kalliomaki, M.A., Isolauri, E., 2004, Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 24, 739-752, viii.

Kimber, I., Stone, S., Dearman, R.J., 2003, Assessment of the inherent allergenic potential of proteins in mice. *Environ. Health Perspect.* 111, 227-231.

Knippels, L.M., Houben, G.F., Spanhaak, S., Penninks, A.H., 1999a, An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* 19, 78-82.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., 2002, Assessment of protein allergenicity: studies in brown norway rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 964, 151-161.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., 2003, Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. *Environ. Health Perspect.* 111, 233-238.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Houben, G.F., 1998a, Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, 815-820.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Smit, J.J., Houben, G.F., 1999b, Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 161-169.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., Spanhaak, S., Houben, G.F., 1998b, Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin. Exp. Allergy* 28, 368-375.

Knippels, L.M., Penninks, A.H., van Meeteren, M., Houben, G.F., 1999c, Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem. Toxicol.* 37, 881-888.

Knippels, L.M., van der Kleij, H.P., Koppelman, S.J., Houben, G.F., Penninks, A.H., 2000, Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy* 55, 251-258.

Koppelman, S.J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A.C., Knol, E.F., 2004, Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clin Exp Allergy* 34, 583-590.

Li, X.M., Kleiner, G., Huang, C.K., Lee, S.Y., Schofield, B., Soter, N.A., Sampson, H.A., 2001, Murine model of atopic dermatitis associated with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 107, 693-702.

Li, X.M., Schofield, B.H., Huang, C.K., Kleiner, G.I., Sampson, H.A., 1999, A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 103, 206-214.

Li, X.M., Serebrisky, D., Lee, S.Y., Huang, C.K., Bardina, L., Schofield, B.H., Stanley, J.S., Burks, A.W., Bannon, G.A., Sampson, H.A., 2000, A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol* 106, 150-158.

Madsen, C., Pilegaard, K., 2003, No priming of the immune response in newborn brown norway rats dosed with ovalbumin in the mouth. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130, 66-72.

Matsuzaki, T., Chin, J., 2000, Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol.Cell Biol.* 78, 67-73.

Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1998, The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci.* 81, 48-53.

Mori, A., Yamamoto, K., Suko, M., Watanabe, N., Ito, M., Miyamoto, T., Okudaira, H., 1990, Interleukin-4 gene expression in high and low IgE responder mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92, 100-102.

Ogawa, T., Miura, S., Tsuzuki, Y., Ogino, T., Teramoto, K., Inamura, T., Watanabe, C., Hokari, R., Nagata, H., Ishii, H., 2003, Chronic allergy to dietary ovalbumin induces lymphocyte migration to rat small intestinal mucosa that is inhibited by MADCAM-1. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 00183.

Osborn, D.A., Sinn, J.K., 2007, Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006475.

Pauwels, R., Bazin, H., Platteau, B., van der Straeten, M., 1979, The effect of age on IgE production in rats. *Immunology* 36, 145-149.

Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E.M., Nuutila, J., Salminen, S., 1998, Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28, 1474-1479.

Penninks, A.H., Knippels, L.M., 2001, Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol.Lett.* 120, 171-180.

Perdigon, G., Medina, M., Vintini, E., Valdez, J.C., 2000, Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 13, 141-150.

Pilegaard, K., Madsen, C., 2004, An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicology* 196, 247-257.

Prescott, S.L., Dunstan, J.A., Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., Richmond, P., 2005, Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 35, 1557-1564.

Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U.C., Schmidt, I., Jahreis, G., 2007, The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy*.

- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S.D., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., Paerregaard, A., 2003, Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111, 389-395.
- Russell, W.M.S.I., Burch, R.L., 1959, *The Principles of Humane Experimental Technique*. Universities Federation for Animal Welfare Wheathampstead, England (reprinted in 1992).
- Savilahti, E., Kuitunen, M., Vaarala, O., 2008, Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8, 243-248.
- Shida, K., Makino, K., Morishita, A., Takamizawa, K., Hachimura, S., Ametani, A., Sato, T., Kumagai, Y., Habu, S., Kaminogawa, S., 1998, *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 115, 278-287.
- Shida, K., Takahashi, R., Iwadate, E., Takamizawa, K., Yasui, H., Sato, T., Habu, S., Hachimura, S., Kaminogawa, S., 2002, *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 32, 563-570.
- Sistek, D., Kelly, R., Wickens, K., Stanley, T., Fitzharris, P., Crane, J., 2006, Is the effect of probiotics on atopic dermatitis confined to food sensitized children? *Clin Exp Allergy* 36, 629-633.
- Taylor, A.L., Dunstan, J.A., Prescott, S.L., 2007, Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: A randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 119, 184-191.
- van der Meide, P.H., Groenestein, R.J., de Labie, M.C., Aten, J., Weening, J.J., 1995, Susceptibility to mercuric chloride-induced glomerulonephritis is age-dependent: study of the role of IFN-gamma. *Cell Immunol* 162, 131-137.
- van Wijk, F., Hartgring, S., Koppelman, S.J., Pieters, R., Knippels, L.M., 2004, Mixed antibody and T cell responses to peanut and the peanut allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 and Ara h 6 in an oral sensitization model. *Clin Exp Allergy* 34, 1422-1428.
- van Wijk, F., Nierkens, S., Hassing, I., Feijen, M., Koppelman, S.J., de Jong, G.A., Pieters, R., Knippels, L.M., 2005, The effect of the food matrix on in vivo immune responses to purified peanut allergens. *Toxicol Sci* 86, 333-341.
- Viljanen, M., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen-Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M., 2005, Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60, 494-500.
- Yamanishi, R., Yusa, I., Bando, N., Terao, J., 2003, Adjuvant activity of alum in inducing antigen specific IgE antibodies in BALB/c mice: a reevaluation. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 166-169.

